

Aus dem Institut für Klinische Physiologie im
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.med. Klaus Hierholzer

**Der Einfluss von Succinat auf die Natriumresorption
und den Metabolitstatus der isoliert perfundierten
Rattenniere**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ingrid Krause
Berlin

1984



Am 22. Juni 1922 ist der Herrmann Weydahl im
Krankenhaus Städt. der Friedr. Schlegel-Schule
Gießen gestorben. Der Herrmann Weydahl war 1864 geboren.

Der Einfluss von Sauerstoff auf die Naturgeschichte
und den Metabolismus der Harnstoff-permeablen
Rattenlinie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Der Einfluss von Succinat auf die Natriumresorption
und den Metabolitstatus der isoliert perfundierten
Rattenniere**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ingrid Krause
Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Klaus Hierholzer
Koreferent: Prof. Dr. Theodor Günther

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 23. Februar 1984

Der Einfluß von Succinat auf die Na-Resorption und
den Metabolitstatus der isoliert perfundierten
Rattenniere

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1.0 EINLEITUNG	1
2.0 METHODEN	3
2.1 Versuchstiere	3
2.2 Operationstechnik	3
2.3 Perfusortechnik	5
2.4 Perfusionsmedium	7
2.5 Versuchsaufbau	9
3.0 VERSUCHSPROTOKOLL	10
3.1 Clearance Experimente	10
3.2 Kurzperfusion	12
3.3 Aufarbeitung	14
3.4 Metabolitanalysen	15
3.5 Statistik	23
4.0 ERGEBNISSE	24
4.1 Clearance Studien	24
4.2 ^{14}C Succinat-Clearance Studien	25
4.3 Metabolitbestimmungen	27
5.0 DISKUSSION	29
6.0 ZUSAMMENFASSUNG	35
7.0 ABKÜRZUNGEN	36
8.0 LITERATUR	38
9.0 LEBENSLAUF	45

1.0 EINLEITUNG

Die hepatische Gluconeogenese hat ihre Bedeutung darin, daß dem Organismus auch im Hungerzustand leicht verstoffwechselbare Glucose, insbesondere für den Stoffwechsel des Zentralnervensystems, zur Verfügung gestellt wird.

Überraschenderweise findet sich im Hungerzustand jedoch auch eine ausgeprägte Gluconeogenese der Niere, die auf die Gewichtsbasis bezogen selbst die hepatische Gluconeogenesekapazität übertrifft (22). Die physiologische Bedeutung der renalen Gluconeogenese ist noch sehr unzureichend geklärt. Sie wird heute vor allem im Zusammenhang gesehen mit der renalen Regulation des Säurebasenhaushaltes. Die bei metabolischer Azidose stark induzierte Ammoniogenese geht mit einer gesteigerten Gluconeogenese einher, auch ohne daß eine Hungersituation vorliegt.

Das aus Amino- und Amidostickstoff, insbesondere des Glutamins, gewonnene NH_4 wird im Rahmen der renalen Regulation des Säurebasenhaushaltes zur Einsparung von Kationen (Na/K) adaptativ in zunehmendem Umfang gebildet und tubulär ausgeschieden (14). Die im Intermediärstoffwechsel der Niere verbliebenen Ketosäuren können über die bei Azidose stimulierte Gluconeogenese zu Glucose metabolisiert werden. Dies geschieht in der Weise, daß bei Decarboxylierung von C_4 -Körpern (Oxalacetat) entstehendes CO_2 durch die Atmung entfernt wird. Das Studium der Regelmechanismen der renalen Gluconeogenese und Ammoniogenese wurde bislang vor allem an Schnitten der Nierenrinde und isolierten Nierentubuli durchgeführt (11,12, 13,15).

Dies hat einen guten Einblick in die regulativen Prozesse erbracht, insbesondere auch die spezifischen Unterschiede zur hepatischen Gluconeogenese. Problematisch blieb jedoch die Interpretation dieser Regelmechanismen im Zusammenhang mit der Gesamtnierenfunktion.

So ist die Bedeutung der regulativen Einwirkung von Katecholaminen und Parathormon noch weitgehend unklar.

Als unter Hemmstoffen des Na-Transportes (Ouabain, Diuretika) erstmals eine Steigerung der Gluconeogenese in vitro nachweisbar wurde (8, 11, 9,), stellte sich die Frage, ob eine Abhängigkeit zwischen Ionentransport und Gluconeogenese besteht, z. B. über den Zugriff zu einem gemeinsamen Energiepool.

In Untersuchungen an isoliert perfundierten Rattennieren (39) konnte 1971 gezeigt werden, daß neben Ionentransporten auch eine hohe Gluconeogeneserate nachweisbar war. Die Beobachtung, daß ein Vorläufersubstrat der Gluconeogenese (Succinat) an diesem experimentellen Modell zu einer deutlichen Natriurese führte, während andere Substrate die Natriumkonservierung verbesserten, war Ausgangspunkt dieser Arbeit. Ziel der Arbeit war es aufzuzeigen, unter welchen Bedingungen eine gegenseitige Abhängigkeit von Natriumtransport und Gluconeogenese erkennbar wird.

2.0 METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Ratten des Hannover Wistar Stammes (SPF = spezifiziert pathogenfrei) der Landesversuchstieranstalt Hannover mit einem Gewicht von 170 bis 240 g eingesetzt. Die Ratten hatten freien Zugang zu Trockenpreßfutter der Firma Altromin Lage/Lippe und Leitungswasser.

2.2 Operationstechnik

Die Ratten wurden mit Inactin^R, Promonta, intraperitoneal (100 mg/kg Rattengewicht) narkotisiert. Die Operationstechnik wurde aus der Methode von Weiss und Mitarbeitern (43) und Nishiitsutsuji - Uwo und Mitarbeitern (29) entwickelt. Zu Beginn der Operation wurde die rechte V.jugularis freipräpariert und ein Katheter zur Volumensubstitution mit heparinisierter Kochsalzlösung eingebunden. In die A.carotis wurde ein Katheter zur Blutdruckmessung nach proximal vorgeschoben. Der chirurgische Zugang in die Bauchhöhle erfolgte durch eine mediane Laparotomie von der Symphyse bis zum Xyphoid. Zur Perfusion wurde ausschließlich die rechte Niere verwendet. Der besseren Übersicht wegen wurde ein Rippenbogenrandschnitt unter Abklemmung der Wundränder vorgenommen.

Die Niere wurde aus dem sie umgebenden Fett - und Bindegewebe freigelegt und mobilisiert. Ebenso wurde mit dem Ureter verfahren, in den ein selbstgezogener Polyäthylkatheter mit ca. 0,6 mm Innendurchmesser eingebunden wurde. Der Urin wurde in Eppendorftöpfchen, Microtubes 3810, gesammelt und das Urinvolumen aus gravimetrischen Messungen berechnet.

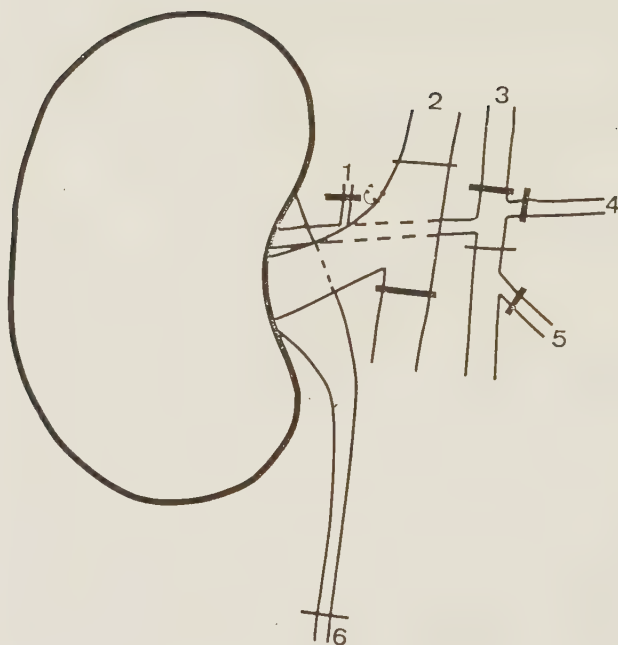


Abbildung 1

Operationsschema

1. A. suprarenalis, 2. V. cava, 3. Aorta, 4. A. mesenterica,
5. A. renalis sin., 6. Ureter.

Dann wurden die arteriellen und venösen Gefäße im Bereich der rechten Niere freipräpariert und Abbindelegaturen um die A.renalis sin., die A.mesenterica, die A.suprarenalis dex. und um die Aorta proximal der A.renalis dex. gelegt. Caudal der A.renalis dex. wurde die Einbindelegatur für die Perfusionskanüle, die Abbindelegatur für die Aorta sowie ein Halbsfaden um die Aorta geschlungen. Distal der V.renalis dex. wurde eine Einbindelegatur für die Venenkanüle um die V.cava gelegt.

Die rechte Niere wurde dann in eine temperierte, vernickelte Kupferschale gebettet, mit dünnen Wattesträngen immobilisiert und mit temperiertem Paraffinöl überschichtet.

Die Temperatur der Schale wurde durch ein Wasserumlaufsystem auf 37°C gehalten.

2.3 Perfusionstechnik

Zur Perfusion wurde eine Kanüle aus rostfreiem Edelstahl (Abb. 2) verwendet. In das Lumen (0,7 mm) der Perfusionskanüle war eine Kanüle zur Druckmessung mit einem inneren Durchmesser von 0,2 mm eingelegt.

Die Druckkanüle war über einen mit heparinisierten 0,9 % Kochsalzlösung gefüllten Schlauch mit einem Druckaufnehmer der Fa. Statham Instruments Typ P23 Db verbunden. Diese Versuchsanordnung ermöglichte die Perfusionsdruckmessung unmittelbar vor der Niere. Der Druck wurde über einen Differenzverstärker (Hewlett Packard) und mit Hilfe einer Regelpumpe nach Lutz (27) (Fa. Stinzig, Würzburg) konstant auf 80 mmHg gehalten.

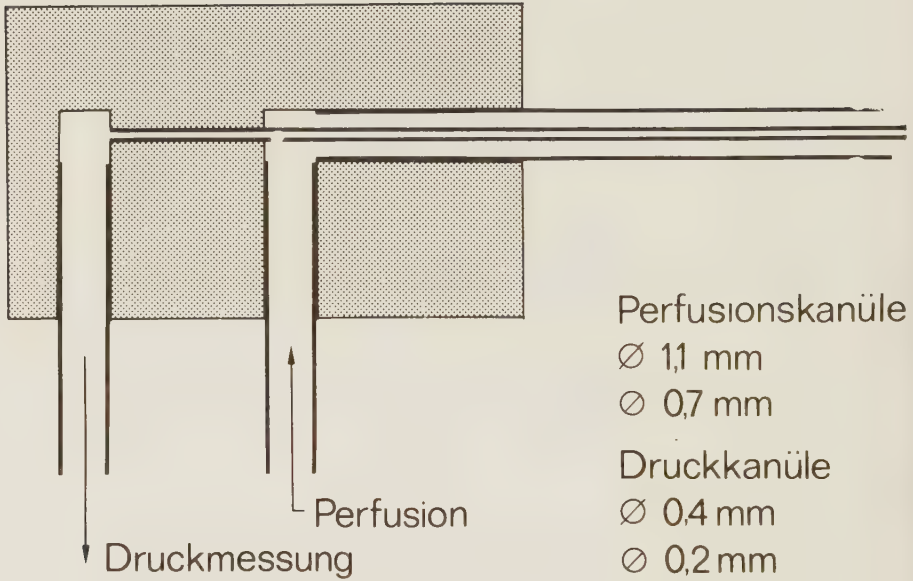


Abbildung 2:

Perfusionskanüle

Perfusionskanüle aus rostfreiem Edelstahlrohr eingelegt in einen Plastikblock. Die Einkerbung an der Kanülenspitze diente als Halterung für die Einbindeligatur.

Die Aorta wurde distal der A. renalis dex. durch eine Klemme verschlossen und alle arteriellen Ligaturen zugezogen. Die Kanüle wurde von einem Einschnitt in der Aorta distal des Abganges der linken Nierenarterie eingeführt und bis zur Klemme vorgeschoben. Die proximale Aortenligatur wurde dann zugezogen und die Klemme von der Aorta abgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Perfusion mittels der Pumpe gestartet. Unmittelbar danach wurde die V.cava geöffnet und die Gefäße jenseits der Ligaturen und die Grenzstränge durchtrennt. Nach Absenken des Operationstisches und Durchschneiden des Bindegewebes war die Niere isoliert. Im Anschluß daran wurde eine Metallkanüle in den proximalen Stumpf der V.cava eingebunden und die distale V.cava ligiert. Ein aliquoter Anteil venösen Perfusates wurde mit einer Rollenspumpe ratenkonstant (1,5 ml/min.) durch die O₂ und CO₂ Elektrode gezogen.

2.4 Perfusionsmedium

Das Perfusionsmedium wurde aus einer Stammlösung von 4,67 % Haemaccel hergestellt mit einer Endkonzentration von 3,5 %. Die Stammlösung wurde aus Haemacceltrockensubstanz der Behringwerke/Marburg mit Aqua Bidest angesetzt und durch parallel angeordnete Asbestfilter der Fa. Seitz mit einer Porengröße von 1,0 μ - 1,5 μ filtriert

Der EKS Asbestfilter ist ein Pyrogenadsorptionstiefilter. Hinter dem Asbestfilter befand sich ein Sartoriusfilter (Fa. Sartorius, Göttingen) mit einer Porengröße von 3 μ als Faserfänger. Im Anschluß an die Filtration wurde die Haemaccelstammlösung 30 Minuten bei 110° C autoklaviert und innerhalb von 30 Minuten abgekühlt (Kühlwasserversprühung).

Tabelle 1

Zusammensetzung des Perfusionsmediums

Substanz	Konzentration (mM/l)
NaCl ^x	118
KCL	5
NaHCO ₃	25
CaCl ₂	1
MgCl ₂	0,6
Na ₂ HPO ₄	> 0,72
NaH ₂ PO ₄	
D-Glucose	4
Harnstoff	6
ADH (Pitressin) ^R	10 mU/l
Inulin	300 mg/l
Haemaccel	35 g/l

x) Äquivalente Verringerung der NaCl-Zugabe bei Einsatz von di-Na Succinat.

Meßgrößen des Perfusionsmediums

Osmolalität	<u>300 m Osmol</u> Kg H ₂ O
pH (95 % O ₂ /5 % CO ₂)	7,42
pO ₂ (" " " ")	680 - 700 mmHg
pCO ₂ (" " " ")	36 mmHg

In Kontrollen konnten keine Pyrogene und Bakterien nachgewiesen werden.

Der Elektrolytgehalt des 4,67 % Lösungsansatzes betrug 22,4 mM Na^+ und weniger als 0,3 mM K^+ . Ca Ionen waren nicht nachweisbar. Der Natriumgehalt der Stammlösung wurde beim Zusatz der sterilen NaCl Konzentrate berücksichtigt. Bei Perfusion mit di-Na Succinat wurde die Zugabe von NaCl um die äquivalente an das Succinat gebundene Menge verringert.

Das Perfusionsmedium wurde in sterilen Glasgefäßen aus 750 (1.500) ml 4,67 % Haemaccelstammlösung und sterilen Elektrolytkonzentraten (s. Tab. 1) angesetzt und mit sterilem Aqua dest., Braun, Melsungen, auf 1.000 (2.000) ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium durch einen gassterilisierten Sartoriusfilter mit einer Porengröße von 0,2 μ filtriert. Das filtrierte Medium wurde in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Carbogen (5 % CO_2 /95 % O_2) begast.

Vor jeder Perfusion wurde zur Überprüfung der Begasung und der Bicarbonatmenge der pH Wert mit einem pH Meter der Firma Radiometer bestimmt. Der pH Wert betrug im Mittel $7,42 \pm 0,02$.

2.5 Versuchsaufbau

Sämtliche zum Versuchsaufbau gehörigen Glas- und Plastikteile wurden in P_3 (Fa. Henkel & Cie.) 1:100 verdünnt aufbewahrt und vor dem Versuch mit Aqua dest. gespült. Die Glasteile wurden bei 150°C über Nacht hitzesterilisiert. Das Perfusionsmedium wurde in Glasbehältern in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 38,5°C eingestellt. Das Medium wurde mit Carbogen (95 % O_2 /5 % CO_2) gegen eine

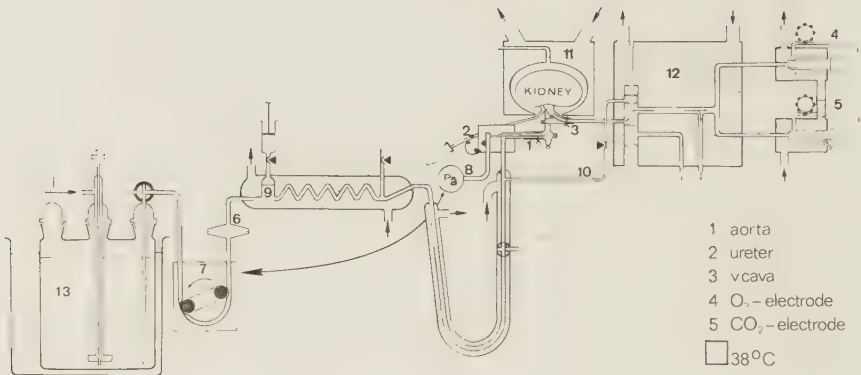


Abbildung 3:

Schematischer Aufbau der Perfusionsapparatur

1 - 5 siehe Bildlegende

6 Filter, 7 Servopumpe, gesteuert durch Rückkopplungssignal des 8 Druckaufnehmers, der mit der Innenkanüle der doppel-läufigen Perfusionskanüle verbunden ist, 9 Windkessel, 10 Bypass für arterielle Gasdruckmessung, 11 Nierenschale, 12 Ventilblock und 13 Vorratsflasche (2000 ml).
 Perfusionskanüle siehe Detailbild Abb. 2.

1 m hohe Wassersäule begast. Hinter den Perfusionsbehältern befand sich eine Servopumpe nach Lutz, die durch das Signal des Druckaufnehmers an der Kanüle geregelt wurde und einen konstanten Perfusionsdruck aufbaute. Daran schloß sich ein Sartoriusfilter mit einer Porengröße von 12μ an. Zwischen dem Filter und der anschließenden temperierten Perfusionsleitung befand sich ein Windkessel. Danach folgte das Perfusionsbesteck, die Nierenschale und das Mehrwegeventil, durch das ein aliquoter Teil des venösen Effluates mit einer ratenkonstanten Rollenpumpe durch die O_2 und CO_2 Elektrode gezogen wurde. Der Perfusionsdruck, der Fluß, pO_2 und pCO_2 wurden mit einem Rikadenki Mehrkanalschreiber registriert. Der CO_2 Druck des Perfusionsmediums und des Effluates wurde mit einer Severinghaus Elektrode (Modell 9987100) der Fa. Beckmann gemessen. Die CO_2 Elektrode wurde mit je einem 4 und 8 % CO_2 enthaltenden Gasgemisch, das auf $38^\circ C$ angewärmt war, kalibriert. Der Sauerstoffgehalt der Lösungen wurde mit einer Clark O_2 Elektrode gemessen (Beckman Instruments). Die O_2 Bezugselektrode wurde vor jedem Versuch mit Silberchlorid galvanisiert. Der Nullpunkt wurde in einer temperierten Na-thio-sulfatlösung eingestellt. Die Kalibrierung erfolgt in O_2 begaster 0,9 % NaCl-Lösung bei $38^\circ C$. Nach jedem Versuch erfolgte eine Nacheichung, so daß eine evtl. Abweichung der Elektroden rechnerisch korrigiert werden konnte.

3.0 VERSUCHSPROTOKOLL

3.1 Clearance Experimente

Es wurden Experimente mit Substratkonzentrationen von 1 mmol/l di-Na Succinat, 4 mmol/l di-Na Succinat und 10 mmol/l di-Na Succinat durchgeführt. Die Dauer des Einzelexperimentes erstreckte sich über 110 Minuten.

Drei Urinsammelperioden von der 20. bis 60. Minute und zwei Urinsammelperioden von der 90. bis 110. Minute unter Standard Haemacelllösung dienten als Kontrollen gegenüber der Succinatperfusion. Von der 60. bis 85. Minute wurde mit einer Succinat-Haemacelllösung perfundiert und in dieser Zeit zweimal über 10 Minuten Urin gesammelt.

Versuche mit technischen Mängeln wurden verworfen.

Die Funktionsparameter waren die Clearance von Inulin, Natrium, Kalium und Glucose. Natrium und Kalium wurden mit dem IL 343 Flammenphotometer der Firma Instruments Laboratory analysiert. Die Glucosekonzentration im Urin wurde mit der Hexokinase-methode nach F. H. Schmidt (36) am Zeiss PMQ Spektralphotometer bei 340 nm oder am Eppendorf Filterphotometer bei einer Wellenlänge von 334 nm bestimmt.

Die Konzentration wurde berechnet:

$$c = \frac{E \times F \times V}{6,22 \times 10^6 \times d \times v}$$

E = Extinktion

V = Volumen der Küvette

v = Volumen des Extraktes

F = Extrahierungsfaktor

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Molarer Extinktionskoeffizient = $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ M}$

Die Inulinkonzentration wurde mit dem Reagenz Anthron (Fa. Merck) bestimmt nach der Methode von Führ, J. et al (10).

Die Extinktionen wurden am Eppendorf Filterphotometer bei 578 nm gemessen. Die Anthronmethode erfaßt spezifisch

Ketosen. In geringerem Umfang kommt es auch mit Glucose zur Reaktion. Zur Bestimmung der Inulin-clearance wurde die Plasmaextinktion der Anthronprobe um den Glucose-leerwert korrigiert. Diese Korrektur wurde bei Urinproben nicht vorgenommen, da die Urinproben entsprechend der Konzentrationsleistung der Niere 3 - 6fach verdünnt waren und die Glucosekonzentration im Endurin erheblich kleiner war als diejenige im Plasma.

3.2 Kurzperfusionen

Um Metabolitveränderungen zu erfassen, wurden mit jeder der oben angegebenen Succinatkonzentrationen Kurzperfusionen durchgeführt. Es wurden in jeder Serie 6 Nieren perfundiert. Prinzipiell erfolgte die Perfusion mit anschließendem Gefrierstopp in situ. In den ersten 10 Minuten wurden die Nieren mit Normalmedium perfundiert. Von der 11. bis 30. Minute wurde die Perfusion mit Succinatmedium fortgesetzt. Zwischen der 30. und 35. Minute wurde die Niere bei noch andauernder Perfusion gefriergestoppt. Hierzu wurde die Niere mit einem Nierenheber (44) innerhalb von 1 - 2 sec. senkrecht gestellt und nach der Methode von Wollenberger gefriergestoppt. Durch eine Aussparung im Nierenheber für den Nierenhilus war die Weiterperfusion innerhalb der Sekunde bis zum Gefrierstopp gesichert. Die im flüssigen N_2 vorgekühlte Kupferzange hatte entsprechend der Führungsschiene des Nierenhebers in beiden Backen eine Aussparung. Diese diente der Führung der Zange und ermöglichte es, Hilus und Papille ausstanzen. Ebenso wurden am Zangenrand überstehende Gewebeteile abgeschlagen. Durch eine Abstandsnocke auf einer Zangenbacke erhielten wir standardisierte Platten von Nierengewebe. Das gewonnene Material wurde bis zur Aufarbeitung, 12 bis 24 Stunden später, in flüssigem N_2 aufbewahrt.

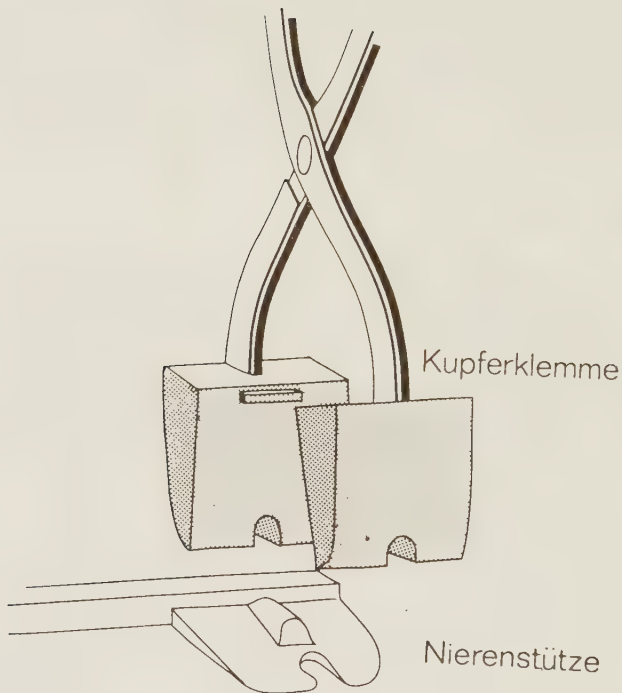


Abbildung 4

Nierenstütze und Gefrierzange

Nierenstütze aus Plexiglas; Aussparung zur Aufnahme des Nierephilus; zur Führung der Gefrierzange angebrachte Führungsschiene. Gefrierzange modifiziert nach Wollenberger mit Abstandsnocke zur Gewinnung gleich dicker Gewebescheiben.

3.3 Aufarbeitung

Das gefrorene Nierengewebe wurde in flüssigem N_2 zermörsert und nach dem Verdampfen des Stickstoffes in 1 ml 0,6 mol/l $HClO_4$ gegeben. Das mit 1.000 μ l $HClO_4$ gefüllte Gefäß wurde vor und nach der Gewebepulvereinfüllung gewogen und aus der Differenz die Einwaage berechnet. Die Aufarbeitung des sauren Extraktes erfolgte durch Ultraschalleinwirkung mit einem Gerät der Firma Bronson Sonic Power, Danbury, USA, in zwei Bearbeitungsgängen. Während dieser folgten auf 20 Sek. Energieeinwirkung 15 Sek. Pause, um eine Überwärmung der Suspension zu vermeiden. Insgesamt wurde die Gewebesuspension 60 Sek. mit einer Energie von 30 - 40 Watt beschallt. Während des Homogenisierens standen die Proben in einem Salz/Eiswasserbad mit einer Temperatur von ca. $-15^{\circ}C$.

Die Suspension des ersten Durchganges wurde zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zentrifugat in 500 μ l Perchlorsäure resuspendiert. Im zweiten Bearbeitungsgang wurde die Resuspension mit 2 x 20 Sek. Ultraschall behandelt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, dekantiert und beide Überstände vereinigt. Innerhalb von 90 - 160 Sek. wurde mit durchschnittlich 440 μ l kalter K_2CO_3 (1 Molar) auf einem pH Wert von 6,0 - 6,5 neutralisiert. Als Indikator der Neutralisation diente pH Papier der Firma Merck, Darmstadt, im pH Bereich von 5,5 - 9,0. Das Neutralisat blieb 10 Min. offen stehen, damit das bei der Neutralisation entstehende CO_2 abbrauchen konnte. Anschließend wurde das Neutralisat zentrifugiert, der Überstand dekantiert, gewogen und eingefroren. Der Verdünnungskoeffizient wurde aus dem Verhältnis von Überstand und Gewebepulvermenge bestimmt.

3.4 Metabolitanalysen

Im Extrakt wurden folgende Metaboliten bestimmt:

- 1) Adenosintriphosphat (ATP) (25)
- 2) Malat (MAL), Glycerinaldehyd-1-P (Glyc-1-P),
Lactat (LAC) (47,20)
- 3) Pyruvat (PRY), Phosphoenolpyruvat (PEP) (2)
- 4) Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat
(AMP)

Die Tests 2, 3, 4 waren kombinierte Tests wie sie von Hohorst et al, Bergmeyer et al und Kirsten (1,19,20,21) angegeben sind.

Zur Bestimmung der Konzentrationen wurden optische Tests angewandt, in denen die zu messenden Metaboliten vollständig umgesetzt wurden. Es wurden mehrere Metaboliten in einem Testansatz bestimmt wie von Hohorst et al (19) beschrieben. Die Messung erfolgte am Eppendorf Filterphotometer bei 334 nm mit automatischem Küvettenwechsler und parallel laufender Registrierung auf einem Philips Punktdrucker mit einer Papiergeschwindigkeit von 300 mm/h. Das ermöglichte eine Registrierung der Reaktionskinetik. Am Ende eines jeden Tests wurde eine Reaktionskontrolle durchgeführt, derart, daß eine definierte Menge des zu bestimmenden Metaboliten zugesetzt wurde. Damit erfolgte eine Prüfung der Enzymqualität und Proportionalität der Reaktion.

Die Metabolitkonzentrationen wurden ebenso berechnet wie die Glukosekonzentration (19). Der tatsächliche Wert für die Extinktionskoeffizienten (E) der Metabolite wurde durch Subtraktion der Eigenextinktion des Enzyms von der Gesamtextinktion errechnet.

Die Analysen der Stoffwechselprodukte waren innerhalb von 24 Stunden nach der Aufarbeitung abgeschlossen. Es war günstig, Pyruvat unmittelbar nach Gewebsaufarbeitung zu messen, da ein Abfall der Pyruvatkonzentration in Pilotserien innerhalb von 24 Stunden zu beobachten war.

Die Bestimmung der Adenosintriphosphatkonzentration unmittelbar nach dem Gefrierstopp zeigte keine höhere Konzentration als 24 Stunden später, d. h., es wurde kein ATP durch Stoffwechselvorgänge verbraucht und in ADP umgewandelt.

Der Vorgang des Gefrierstopps wurde wesentlich durch den Einsatz der Nierenstütze vereinfacht. Vergleichsserien ohne Einsatz der Nierenstütze zeigten, daß durch das kurzfristige Hochstellen der Niere sich keine für die Hypoxie typischen Stoffwechselprodukte ansammelten.

Die angegebenen Comixmengen gelten für 6 Doppelbestimmungen in 1 cm Küvetten. Alle Enzyme wurden von der Firma Boehringer bezogen.

Die Substanzen $MgCl_2$, $MgSO_4$, KCl, TRA und Hydrazin waren von der Firma Merck, Darmstadt; die 50 % Glucose von der Firma Fresenius, Bad Homburg.

Herstellung der Pufferlösungen:

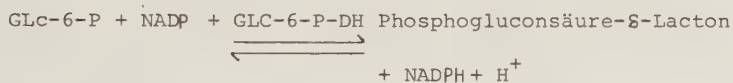
1.) Triäthanolamin Puffer (TRA)

4,65 g Triäthanolamin-hydrochlorid in ca. 200 ml lösen, mit 1 mol/l NaOH Lösung auf pH 7,65 titrieren, ad 500 ml Aqua bidest auffüllen.

2.) Hydrazin-Glycin Puffer: pH 9,5

7,5 Glycin, 5,2 g Hydrazin Sulfat, 0,2 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2-2\text{H}_2\text{O}$ mit Aqua bidest auf 49 ml auffüllen und 51 ml 2 mol/l NaOH Lösung hinzugeben.

Reaktionsmuster, Comix und Küvettenansatz der Enzym-
bestimmungen



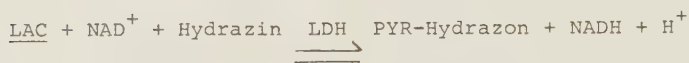
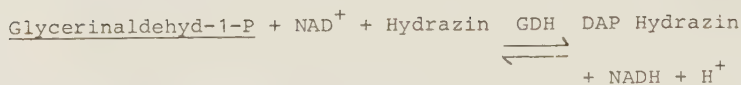
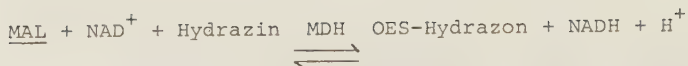
Comix

Küvettenansatz

8 ml TRA (100 mmol/l; pH 7,6	600 µl Comix
150 µl NADP (20 mg/ml)	50 µl Extrakt
150 µl MgCl ₂ (50mmol/l)	10 µl Glucose (60mmol/l)
75 µl GLC-6-P-DH (0,5 mg/ml)	5 µl HK (1 mg/ml) ^x

^x HK 100 µl zentrifugieren/dekantieren in 100 µl
H₂O pendieren

ATP Eic. 12,1 g/100ml H₂O; 200 mmol)



Comix

2 ml Aqua Bidest
5 ml Hydrazin Puffer (pH 9,5)
0,5 ml NAD (60 mmol/l)

Küvettenansatz

500 µl Comix
100 µl Extrakt
5 µl MDH (1 mg/ml)
5 µl GDH (1 mg/ml)
5 µl LDH (1 mg/ml)

MDH 50 µl zentrifugieren/dekantieren/in 100 µl H ₂ O resuspendieren		
GDH 100 µl "	/"	/in 50 µl H ₂ O resuspendieren
LDH 100 µl "	/"	/in 100 µl H ₂ O resuspendieren

Malat Eichlösung: 10 µl 1 mol.Lösg./10 ml H₂O

Lactat Eichlösung: 10 µl 1 mol.Lösg./10 ml H₂O



Lösungen

NADH 10 mg/1000 µl TRA (pH 7,65; 100 mmol/l)

ADP 10 mg/ 250 µl TRA (pH 7,65; 100 mmol/l)

KCl 3,7 mol/l

MgSO₄ 0,5 mol/l

LDH (1 mg/ml) 100 µl zentrifugieren, dekantieren in
100 µl H₂O resuspendieren

Pyr Eichlösung 55 mg/1000 ml H₂O

PEP Eichlösung 9,3 mg/ 40 ml H₂O

Küvettenansatz

300 µl TRA (pH 7,6; 100 mmol/l)

300 µl Extrakt

10 µl NADH

5 µl LDH 1 mg/ml

5 µl ADP

10 µl MgSO₄

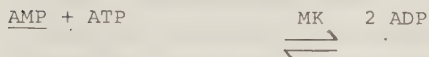
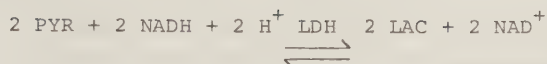
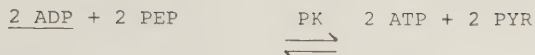
5 µl KCl

5 µl PK 1 mg/ml

5 µl Enolase 1 mg/ml

je 10 µl Eichlösungen der Substrate

je 5 µl Enzyme



Comix

Küvettenansatz

8 ml TRA	(pH 7,6; 100 mmol/l)	500 µl Comix
200 µl NADH	(10 mg/1000 µl TRA)	50 µl Extrakt
200 µl MgCl ₂	(50 mmol/l)	5 µl PK
200 µl PEP	(10 mg/500 µl H ₂ O)	5 µl MK
35 µl LDH	(1 mg/ml)	+ 10 µl Eichlösung

Lösungen

NADH 0,010 g/1000 µl TRA (pH 7,6; 100 mmol/l)
 PEP 0,010 g/500 µl H₂O
 LDH 1 mg/ml 200 µl zentrifugieren, dekantieren und in
 200 µl H₂O resuspendieren
 PK 50 µl + 50 µl TRA (2 mg/ml; 43 mmol/l)
 MK 2 mg/ml

ADP Eichlösung 0,02 g/1000 µl TRA davon
 10 µl/500 µl TRA

3.5 Statistik

Durch das angewendete experimentelle Vorgehen war es möglich, zur statistischen Sicherung der Ergebnisse Paaranalysen durchzuführen. Pro Urinsammelperiode wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und die Standardabweichung des Mittelwertes für die Clearance Experimente berechnet. Die in Tabelle 3 dokumentierten Kontrollwerte wurden jeweils aus den Mittelwerten der Urinsammelperioden vor und nach der Succinatphase gebildet. Die Daten der Succinatphasen wurden ebenfalls aus den Mittelwerten der beiden Urinsammelperioden unter Succinat errechnet. Die Ergebnisse der Lang- und Kurzzeitperfusionen können zueinander in Beziehung gesetzt werden, da die Versuchsbedingungen der Perfusion nicht verändert wurden. Obwohl die Kurzperfusionen nur 30 Minuten im Vergleich zu 110 Minuten der physiologischen Experimente dauerten, war die Zeit der Substratperfusion mit Succinat annähernd gleich lang, ca. 15 - 20 Minuten.

Um einen Überblick über die Nierenfunktion in den Kurzperfusionen zu erhalten, wurde in jedem Experiment Inulin zugesetzt und die Inulinclearance bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, daß die Lang- und Kurzzeitexperimente miteinander vergleichbar waren. Die Ergebnisse der Metabolitanalysen der Succinat-Haemaccelperfusionen wurden den Metabolitkonzentrationen einer Serie von Haemaccelperfusionen gegenübergestellt. Die in Tabelle 3 aufgeführten Werte entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung des Mittelwertes je einer der Gefrierstoppserien.

4.0 ERGEBNISSE

4.1 Clearance Studien

In Tabelle 3 sind die Funktionsparameter GFR, Na-Transport und Sauerstoffverbrauch aufgetragen wie sie während der Kontrollphase und der experimentellen Succinatperfusion bestimmt wurden. Die unmittelbar vor und nach der experimentellen Succinatperfusion liegenden Clearanceperioden wurden zu einem Mittelwert zusammengefaßt (Kontrolle), mit dem die Daten der experimentellen Succinatperfusion auch statistisch in der Paaranalyse verglichen werden konnten.

Unter dem Einfluß von 1 mM Succinat fand sich keine wesentliche Veränderung der GFR und des Na-Transports. Der Sauerstoffverbrauch stieg um ca. 25 %. Demgegenüber zeigte sich ein Sauerstoffmehrverbrauch um 40 % unter 10 mM Succinat. Im Gegensatz hierzu trat unter 10 mM Succinat eine Verminderung des Na-Transportes auf, sowohl des absoluten als auch des fraktionellen Transportes. Diese Verminderung war nicht mit dem geringen Abfall der GFR zu erklären. Unter 4 mM Succinat zeigte sich außer dem gesteigerten $\dot{Q}_{O_2}$ keine wesentliche Veränderung von GFR oder Na-Transport.

Tabelle 3:

Funktionsparameter der isoliert perfundierten Rattenniere unter
 Succinateinwirkung (60. Min. Normperfusion; 25 Min. Succinatperfusion;
 25 Min. nachgeschaltete Kontrolle)

Zeit 50' - 60' 65' - 85'
 90' - 100'

	Kontrolle	1 mM Succ.	Kontrolle	4 mM Succ.	Kontrolle	10 mM Succ.
% Na-Resorption	87,5 $\pm$ 2,1	86,6 $\pm$ 2,1	80,0 $\pm$ 2,6	81,5 $\pm$ 2,4	79,5 $\pm$ 4,2	71,0 $\pm$ 4,2*
T _{Na} (μ M/min/g Niere)	46,5 $\pm$ 5,7	46,5 $\pm$ 4,9	61,0 $\pm$ 9,1	59,7 $\pm$ 12,0	50,0 $\pm$ 4,5	41,0 $\pm$ 4,5**
O ₂ -Verbrauch (μ M/min./g Niere)	4,0 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,5***
GFR (μ l/min./g Niere)	370,0 $\pm$ 54,4	379,0 $\pm$ 49,3	517,0 $\pm$ 66,7	503,0 $\pm$ 91,5	442,0 $\pm$ 36,0	339,0 $\pm$ 33,0
n	4	4	4	4	4	4

* p < 0,005

** p < 0,001 *** p < 0,5

4.2 ^{14}C Succinat - Clearance Studien

Die Frage, ob es bei der Filtration größerer Mengen von Succinat zu einer Succinat-Diurese, bzw. Natriurese kommen kann, entsprechend der bekannten Sulfatdiurese, hat uns veranlaßt, Clearance Studien mit radioaktiv markiertem Succinat durchzuführen (50 μCi 2,3- ^{14}C Succinat pro Liter Medium). Hierbei wurde deutlich, daß sich die ^{14}C -Succinat-Clearance bei Einsatz von 10 mmol/l "kaltem" Succinat kaum von der Inulin Clearance unterschied.

	X	n
C_{Inulin}	500 $\mu\text{l/g/min}$	4
$\text{C}_{^{14}\text{C-Succinat}}$	450 $\mu\text{l/g/min}$	4

Dies bedeutet, daß das filtrierte Succinat nahezu quantitativ ausgeschieden wurde. Unbefriedigend erklärt blieb die Diskrepanz zwischen den experimentellen Ergebnissen unter 4 mmol/l und 10 mmol/l Succinat. Eine Succinat-diurese wäre auch bei einer Konzentration von 4 mmol/l im Perfusat zu erwarten, zumal hierbei Urinsuccinatkonzentrationen von 20 mmol/l auftreten (2,3- ^{14}C -Succinat-Clearance) könnten.

Zur weiteren Analyse dieser Befunde führten wir Metabolitbestimmungen durch.

Tabelle 4: Metabolitkonzentration im gefriergestopten Nie- engewebe (10-9 M/g FG)

	Kontrolle	1 mM Succ.	4 mM Succ.	10 mM Succ.
ATP	806 ± 67	1.025 ± 23*	754 ± 83**	507 ± 38***
ADP	590 ± 29	467 ± 17	455 ± 35	553 ± 38
AMP	414 ± 42	299 ± 28	313 ± 26	1.145 ± 226****
Σ Adenin - Nukleotide	1.840 ± 46	1.790 ± 23	1.522 ± 48	2.205 ± 100
ATP/ADP	1,3	2,1	1,6	0,9
MAL	122 ± 8	148 ± 119	357 ± 25	415 ± 44
PYR	27 ± 3	50 ± 6	55 ± 2	37 ± 5
LAC	907 ± 111	838 ± 205	632 ± 107	870 ± 95
PEP	162 ± 13	177 ± 18	189 ± 15	84 ± 15
2 P-G	71 ± 6	405 ± 30	78 ± 4	50 ± 5

- 26 -

*	p < 0,025	***	p < 0,005
**	p < 0,02	****	p < 0,0025

4.3 Metabolitbestimmungen

Das durch Gefrierstopp gewonnene Nierengewebe aus Kurzperfusionen wies deutliche Unterschiede im Metabolitgehalt auf in Abhängigkeit davon, wieviel Succinat angeboten wurde. Die ATP-Konzentration stieg unter 1 mmol/l Succinat von 806 nmol/l auf 1.025 nmol/g FG an. Eine Erhöhung der angebotenen Succinatkonzentration im Perfusat führte jedoch zu einem deutlichen Abfall der ATP-Konzentration. Unter 10 mmol/l Succinat lag die Konzentration bei 507 ± 38 nmol/g FG. Große Änderungen fanden sich auch spiegelbildlich in der AMP-Konzentration wieder. Unter 1 mmol/l Succinat lag AMP bei 299 nmol, unter 10 mmol/l bei 1.145 nmol/g FG. Die ADP-Konzentration veränderte sich nur geringfügig. Die ATP/ADP Quotienten als Maß für die Effektivität der ATP-Neusynthese gegenüber den ATP verbrauchenden Prozessen fielen von 2,1 auf 0,9 ab.

Die Konzentration von Malat, das im Krebszyklus zwei Reaktionsstufen hinter Succinat steht, war deutlich abhängig von der angebotenen Succinatkonzentration. Unter 10 mmol/l lag der Wert knapp 4fach über der Kontrolle, siehe Abb. 5.

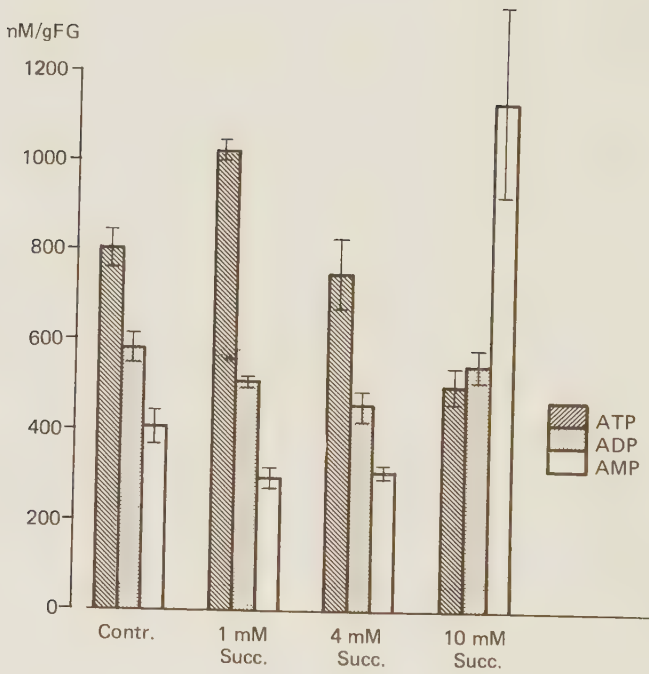
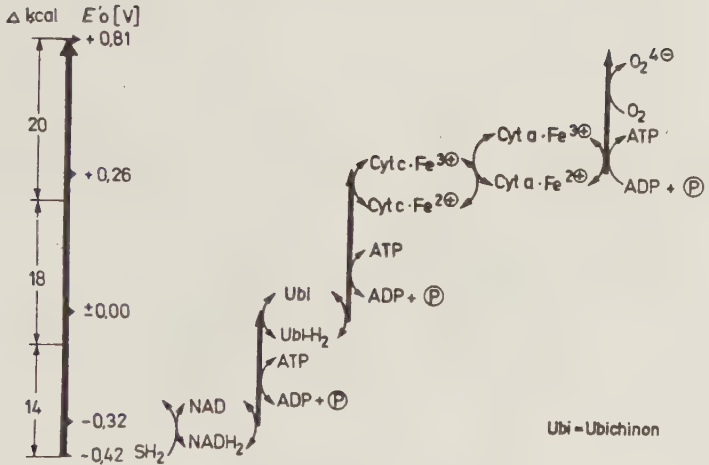


Abbildung 5:

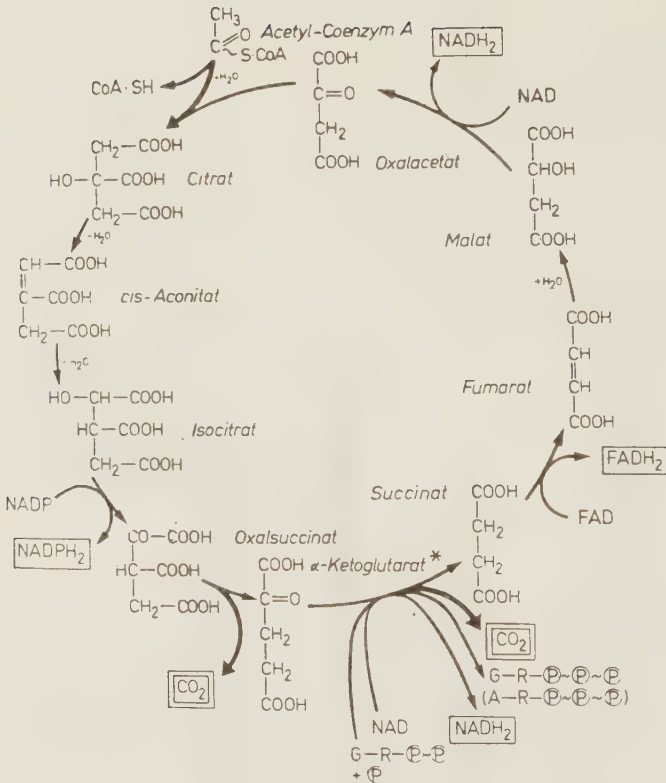
ATP, ADP und AMP unter den eingesetzten Succinat-konzentrationen.

5.0 Diskussion

Bild der Atmungskette



Mit zunehmender Konzentration von Succinat wird dieses bevorzugt veratmet. Dies führt zur Einschränkung des Metabolitumsatzes im vorgeschalteten Anteil des Krebszyklus. Entsprechend vermindert ist dann die Synthese von GTP, das bei der Umwandlung von Succinyl-CoA zu Succinat entsteht. Dieser relative GTP Mangel schränkt die Gluconeogenese ein, so daß sich Malat anhäuft und die Konzentrationen von Phosphoenolpyruvat und 2-Phosphoglycerat abfallen. Decarboxylierende Prozesse laufen nur in dem Maß ab, wie es für die eingeschränkt ablaufende Gluconeogenese erforderlich ist.



Folgende Überlegungen sollen zusätzliche Gesichtspunkte darlegen, wie sie aus den Analysen der Metabolite abgeleitet werden können.

Der niedrige P/O Quotient bei 10 mmol/l Succinat führt wegen des hohen Sauerstoffverbrauches zu einem O₂-Mangel und zu einem ungenügenden Angebot von ATP an die Na-Pumpe (ATPase-System). Die ATP-Konzentration fällt ab, die AMP-Konzentration steigt an.

Abb. 6 stellt den Versuch dar, die Befunde aus Clearance-Experimenten und Metabolitanalysen zusammenzufassen und Rückschlüsse auf den energetischen Status der Niere bei Perfusion mit unterschiedlichen Succinatkonzentrationen zu gewinnen.

Auf der Ordinate ist die turnover-Rate von ATP aufgetragen, die aus dem Sauerstoffverbrauch und fiktiven P/O Quotienten (Abszisse) errechnet wurde. Die zweite Säule zeigt Q_{ATP} unter Succinat bei einem fiktiven P/O Quotienten von 3, die dritte Säule von 2, dann die Zwischenwerte von 2,1 - 2,6. Die Säule mit Schraffur zeigt den Q_{ATP} bei dem jeweils wahrscheinlichsten Kopplungsgrad, bzw. P/O Quotienten.

Dies bedarf einer Erläuterung:

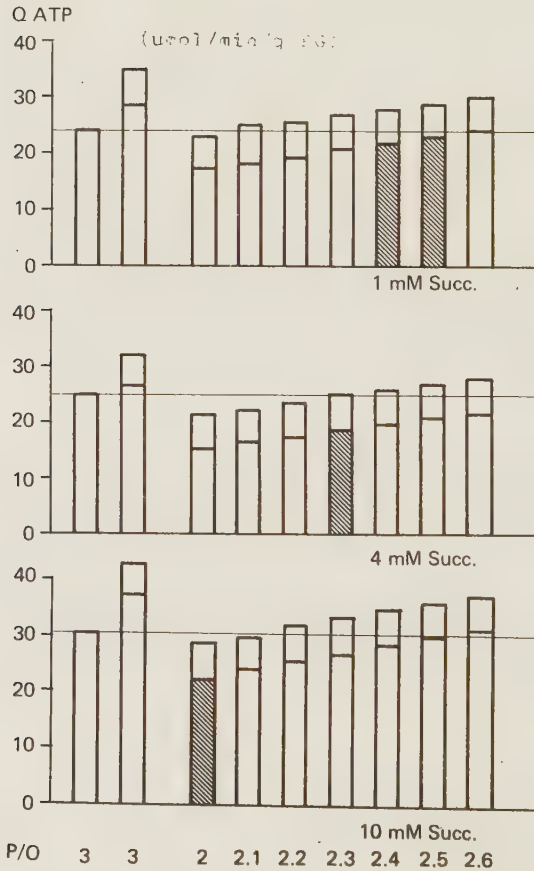
10 mM Succinat: der Q_{O_2} beträgt in der Kontrollphase $5,13 \mu\text{M/g FG}$. Bei einer Kopplung von 3 betrüge der Q_{ATP} $5,13 \times 6 = 30,8 \mu\text{M/g FG}$.

In der experimentellen Phase unter 10 mM Succinat lag der Q_{O_2} bei 7,23; wäre die Kopplung 3, so läge der Q_{ATP} bei $43,3 \mu\text{M/g} \cdot \text{min}$. Dies ist unrealistisch, da einmal der Na-Transport vermindert ist und zum anderen die ATP-Konzentration deutlich abgefallen ist. Mit einem P/O Quotienten von 2 läge Q_{ATP} in einem realistischen Bereich von $28,9 \mu\text{M/g} \cdot \text{min}$.

Zu berücksichtigen ist jedoch noch der unter Succinat zu erwartende ATP-Verbrauch der Gluconeogenese (hier wurden Angaben der Literatur zugrunde gelegt (32)). Nach Abzug von $6,2 \mu\text{mol ATP}$ liegt der für den Na-Transport zur Verfügung stehende Anteil bei $22,7 \mu\text{M/min} \cdot \text{g} \cdot \text{ATP}$. Dies liegt unter dem Kontrollwert und entspricht der Reduktion des Na-Transportes sowie dem Befund, daß die ATP-Konzentration deutlich vermindert ist.

Abbildung 6:

Rechnerisch ermittelte P/O-Quotienten unter 1 mM, 4 mM und 10 mM Succinat.



4 mM Succinat: Bei 4 mmol/l Succinat liegt die ATP-Konzentration im Gewebe etwa in Höhe der Kontrolle. Nimmt man eine gleich hohe Gluconeogeneserate an wie unter 10 mmol/l Succinat, dann findet sich die beste Übereinstimmung mit der Kontrolle bei einem P/O-Quotienten von 2,3. Bei dieser experimentellen Serie steht unter dieser Annahme dem Na-Transport knapp die gleiche Energie zur Verfügung wie in der eigenen Kontrolle.

1 mM Succinat: Bei 1 mmol/l Substratkonzentration im Perfusat liegt der ATP-Gehalt des Gewebes deutlich über den Kontrollwerten ($p < 0,05$). Dies bedeutet bei unverändertem Na-Transport, daß auch der P/O-Quotient nicht bei 2,0 sondern am ehesten bei 2,4 - 2,5 liegt.

Aus diesen Überlegungen möchten wir folgendes ableiten: Der Na-Transport wird durch eine gleichzeitig bestehende Gluconeogenese nicht vermindert. Dies gilt für das Vorläufersubstrat Succinat in einer Konzentration von 1 mmol/l und 4 mmol/l Succinat. Die Nähe der Mitochondrien zum Na-Transportsystem (ATPase System) kann die vorrangige Versorgung dieses Transportes gegenüber anderen Zelleistungen begünstigen. Unter extremen Bedingungen, wie z. B. der O_2 -Mangelsituation unter hohen Succinatkonzentrationen kann die relativ hohe Gluconeogeneseleistung der Tubuluszelle (13) zu einem verminderten Energieangebot für den Na-Transport führen. Die Möglichkeit, daß das nur in geringem Umfang resorbierte Succinat eine Anionendiurese verursacht und damit nur indirekt den Na-Transport vermindert, ist nicht auszuschließen. Die niedrige ATP-Konzentration im Gewebe weist jedoch deutlich auf eine metabolische Komponente hin.

Quantitativ kann das jedoch nicht aufgeschlüsselt werden. Eine weitere Klärung dieser Frage könnte z.B. dadurch erreicht werden, daß unter Messung von O_2 -Verbrauch und Na-Transport in Rezirkulationstechnik gleichzeitig die Gluconeogenese gemessen wird. Eine nicht zu vernachlässigende Schwierigkeit besteht jedoch darin, daß die glucosefreie Perfusion, wie sie für das Studium der Gluconeogenese durchgeführt wird, gleichzeitig große Änderungen des Na-Transportes induzieren kann, sobald Glucose zur Veratmung zur Verfügung steht (34).

Außerdem läßt sich der Anteil der renal metabolisierten Glucose und der Anteil der Gluconeogenese nicht aus der Bilanz entnehmen, insbesondere dann, wenn Glucose im Medium vorliegt.

6.0 Zusammenfassung

Zur Klärung der Frage, ob die tubuläre Na-Rückresorption und die Gluconeogenese der Niere durch Abhängigkeit vom gleichen Energiepool sich gegenseitig beeinflussen, wurden mit einem Vorläufersubstrat der Gluconeogenese - Succinat - Perfusionen an isolierten Rattennieren durchgeführt. Es wurden je 6 isolierte Rattennieren mit 1,4 und 10 mmol/l di-Na-Succinat in der Versuchsphase perfundiert. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung des Na-Transportes unter 10 mmol/l di-Na Succinat. Durch eine stimulierte Gluconeogenese unter 1 und 4 mmol/l Succinat wird der Na-Transport nicht eingeschränkt.

Zur Feststellung des Metabolitstatus unter Einfluß von di-Na Succinat wurden Kurzperfusionen durchgeführt mit anschließendem Gefrierstopp des Nierengewebes. Unter 10 mmol/l di-Na Succinat fiel eine signifikante Verringerung des ATP Spiegels sowie eine Verschiebung des ATP/AMP-Quotienten zugunsten von AMP auf. Gleichzeitig war Malat vierfach erhöht und Phosphoenolpyruvat und 2-Phosphoglycerat erniedrigt, so daß eine Einschränkung der Gluconeogenese abgeleitet werden kann.

Es kann nun vermutet werden, daß unter hohen Succinatkonzentrationen das ATP für die Gluconeogenese verbraucht wird und nicht mehr ausreichend für den Na-Transport zur Verfügung steht. Nicht ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, daß das nur zum Teil resorbierte Succinat zu einer Anionendiurese und damit zu einer Verminderung des Na-Rücktransportes führt.

7.0 ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintribosphat
c-AMP	Cycl. 3'5' Adenosinmonophosphat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH	Flavinadenindinukleotid, reduziert
FG	Feuchtgewicht
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glc.	Glucose
Glc-6-P	Glucose-6-Phosphat
Glc-6-P DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
Hk	Hexokinase
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
KCl	Kaliumchlorid
LAC	Lactat
LDH	Lactatdehydrogenase
MAL	Malat
MDH	Malatdehydrogenase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MK	Myokinase
NAD	Nikotinadenindinukleotid
NADH	Nikotinadenindinukleotid, reduziert
NADP	Nikotinadenindinukleotidphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
2-P-G	2-Phosphoglycerat
3-P-G	3-Phosphoglycerat
PK	Pyruvatkinase
Pyr	Pyruvat
OES	Oxallessigsäure
Cyt c.Fe ³⁺	Cytochrom c mit energiereichen Eisenionen
Cyt c.Fe ²⁺	Cytochrom c mit Eisenionen
Cyt a.Fe ³⁺	Cytochrom a mit energiereichen Eisenionen
Cyt a.Fe ²⁺	Cytochrom a mit Eisenionen

ABKÜRZUNGEN - Fortsetzung

$\dot{Q}_{O_2}$	Sauerstoffverbrauch
$\dot{Q}_{CO_2}$	Kohlendioxidproduktion
$\dot{Q}_{ATP}$	ATP-Verbrauch
SDH	Succinatdehydrogenase
Succ.	Succinat
2,3- ^{14}C Succ.	2,3 radioaktives Succinat
T _{Na}	Tubulärer Na-Nettotransport
T _{Succ.}	Tubulärer Succinatnettotransport
ZF	Zwischenferment=Glucose-6Phosphat-Dehydrogenase

8.0 LITERATUR

1. Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße, (1970), 2. Aufl. Bd.I u.II
2. Cohen, J.J., Kamm, D.E.: Renal metabolism: Relation to renal function. In: The Kidney, Ed.by B.M.Brenner and F.C. Rector, W.B. Saunders Comp. (1976) 179-184
3. Czok, R., Lamprecht, W.: Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.II, 3.Aufl. (1974) 1491-1496, Hrsg. H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
4. Dubach, U.C.: Enzymes in urine and kidney. Verlag Hans Huber, Bern (1968)
5. Edelman, I.S., Fanestil, D.D.: Mineralocorticoids. Biochemical actions of hormones. (1970) 321-360, Ed.by G.Litwack, Academic Press, New York
6. Ernster, L.: Oxidative phosphorylation and its reversal. In: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Ed. by P. Karlson, Springer-Verlag, 98-118 (1963)
7. Faupel, R.P., Seitz, H.J., Tarnowski, W.: The problem of tissue sampling from experimental animals with respect to freezing technique, anoxia, stress, and narcosis. (1972) Arch. Biochem.Biophys. 148, 509-522

8. Friedrichs, D., Schoner, W.: Stimulation of renal glucogenesis by l-alanine and AIB. In: Current Problems in Clinical Biochemistry 4, Biochemical Aspects of Renal Function (1975) 32-33, Ed. by S. Angielski and U.C. Dubach, Hans Huber Verlag, Bern
9. Friedrichs, D. Schoner, W.: Stimulation of renal gluconeogenesis by inhibition of the sodium pump. Biochim.Biophys. Acta 304, 142-160 (1973)
10. Führ, J., Kaczmarczyk, J., Krüttgen, C.D.: Eine einfache Methode zur Inulinbestimmung für Nieren-clearance Untersuchungen bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern. Klin.Wschr.33 729-730 (1955)
11. Fülgraff, G., Nünemann, H., Sudhoff, D.: Effects of the diuretics furosemide, ethacrynic acid and chlorothiazide on gluconeogenesis from various substrates in rat kidney cortex slices. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 86-98 (1972)
12. Guder, W., Schmidt, U.: The localisation of gluconeogenesis in rat nephron. Determination of phosphoenolpyruvate in microdissected tubules. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.355, 273-278 (1974)
13. Guder, W., Wiesner, W., Stukowski, B., Wieland, O.: Metabolism of isolated kidney tubules. Oxygen consumption, gluconeogenesis and the effect of cyclic nucleotides in tubules from starved rats. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.325, 1319-1328 (1971)

14. Guder, W.: Regulation der Gluconeogenese der Niere. Habilitationsschrift, München 1973
15. Guder, W., Wieland, O.: The effect of 3'5' cyclic AMP on glucose synthesis in isolated rat kidney tubules. In: Regulation of Gluconeogenesis (1971) 226-235 Ed.: H.D. Söling and B. Willms, Thieme Verlag Stuttgart
16. Györy, A.Z., Kinne, R.: Energy source for trans-epithelial sodium transport in rat renal proximal tubules. Pflüger's Arch. 327, 234-268 (1971)
17. Henning, H., von Stumpf, B., Ohly, B., Seubert, W.: Effects of cortisol treatment and starvation on the gluconeogenic capacity and the activities of pyruvate carboxylase and PEP-carboxylase of rat kidney. In: Biochemical Aspects of Kidney Function, (1972) 67-80. Ed. by M. Hohenegger, Goldmann Verlag, München
18. Höhmann, B.: Distribution of enzyme activities of succinate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in the nephron of the rabbit. In: Biochemical Aspects of Kidney Function, (1972) 236-245. Ed. by M. Hohenegger, Goldmann Verlag, München
19. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., Bücher, Th.: Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber der Ratte. Biochem. Zschr. 332, 18-46 (1959)

20. Jaworek, D., Gruber, W., Bergmeyer, H.U.: In: Methoden der enzymatischen Analyse Bd.II (1970) 2051-2053, 2.Aufl. Hrsg. H.U.Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
21. Kirsten, R.: Persönliche Mitteilung
22. Krebs, H.A.: Gluconeogenesis and Redoxstate Regulation of Glucogenesis. In: Regulation of Gluconeogenesis (1971) 114-117. Ed. by H.D. Söling and B. Willms, Thieme Verlag Stuttgart
23. Krebs, H.A., Bennet, D.A.H., de Gasquet, P., Gascoyne, T., Kashida, T.: Renal Gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat kidney cortex slices. Biochem.J. 86, 22-27 (1963)
24. Krebs, H.A.: Renal carbohydrate and fatty acid metabolism Renal transport and diuretics. Ed. by K. Thureau & H. Jahrmärker. Internat. Symp.Feldafing 1968. Springer Verlag, Heidelberg (1969) 1-8
25. Lamprecht, W., Trautschold, I.: Adenosin-5-tri-phosphat. Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Methoden der enzymatischen Analyse Bd.II (1970) 3.Aufl., Hrsg. H.U.Bergmeyer 2024-2033, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
26. Lewy, P.R., Quintanilla, A., Levin, N.W., Kessler, R.H.: Renal energy metabolism and sodium reabsorption. Ann.Rev.Med.24, 365-384 (1973)
27. Lutz, J., Henrich, H.: Gefäßkontraktionen in situ bei druck- und stromkonstanter Perfusion der intestinalen Strombahn und ihre Abhängigkeit vom Ausgangsdruck. Pflügers Arch. 319, 68-81 (1970)

28. Maude, D.L.: Effects of substrates and inhibitors of the tricarboxylic acid cycle on proximal tubular fluid transport in vivo. *Biochim.Biophys.Acta* 215, 216-219 (1970)
29. Nishiitsutsuji-Uwo, J.M., Ross, B.D., Krebs, H.A.: Metabolic activities of isolated perfused rat kidney. *Biochem.J.* 103, 852-862 (1967)
30. Nünemann, H., Sudhoff, D., Fülgraff, G.: Untersuchungen über die Wirkung von Furosemid und Ethacrynsäure auf die gluconeogenetische Aktivität der Nierenrinde von Ratten. In: *Biochem. Aspekte der Nierenfunktion* (1972) 281-299. Ed. by M. Hohenegger, Goldmann Verlag, München
31. Pitts, R.F.: *Physiologie der Niere und der Körperflüssigkeiten*. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart (1972) 268-276
32. Rasmussen, H., Nagata, N.: Renal gluconeogenesis: Effects of parathyroid hormone and dibutyryl 3'5' AMP. *Biochim.Biophys.Acta* 215, 17-28 (1970)
33. Ross, B.D.: *Perfusion techniques in biochemistry, a laboratory manual*. Clarendon Press, Oxford (1972)
34. Ross, B.D., Epstein, F.H., Leaf, A.: Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am.J. Physiol.* 225, 1165-1171 (1973)
35. Schmidt, U., Dubach, U.C., Guder, W.G., Funk, B., Paris, K.: Metabolic patterns in various structures of the rat nephron. *Biochem.Aspects of Renal Function*. (1975) 22-32. Ed. by S. Angielski and U.C.Dubach, Hans Huber Verlag, Bern

36. Schmidt, F.H.: Klin.Wschr.39, 1244 (1961), s.a.
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. II,
3. Aufl. 1163-1168, Hrsg. H.U.Bergmeyer, Verlag
Chemie, Weinheim/Bergstraße
37. Schurek, H.J., Brecht, J.P., Brandt, P. Na-
Resorption und O_2 -Verbrauch der isoliert per-
fundierten Rattenniere unter Einwirkung von
Etacrynsäure. Renale Elimination von Pharmaka.
VIII.Symp. der Gesellschaft für Nephrologie,
Aachen (1971), Hrsg. R. Heitz u. H. Holzhüter
89-97
38. Schurek, H.J., Brecht, J.P., Lohfert, H., Hierholzer,
K.: The basic requirements for the function of
isolated cell free perfused rat kidney. Pflüger's
Arch. 354, 349-365 (1975)
39. Schurek, H.J., Brecht, J.P., Lange, K., Kolbe, H.,
Keller, K.: Substrate action on transport and
metabolism of the isolated perfused rat kidney.
In: Biochemical Aspects of Kidney Function. Ed. by
Max Hohenegger, Goldmann Verlag, München (1972)
110-126
40. Seitz, H.J., Faupel, R.P., Kampf, S.C., Tarnowski, W.:
Influence of different types of narcosis and neck-
fracture on the concentration of glycolytic interme-
diates and related compounds in rat liver. Arch.
Biochem. Biophys. 158, 12-18 (1973)
41. Simpson, D.B., Angielski, S. Regulation by bicarbonate
ion of intermitochondrial citrate concentration in
kidney mitochondria. Biochem.Biophys. Acta 298,
115-123 (1973)

42. Silva, P., Hallac, R., Swartz, R., Epstein, F.H.
Competition between different metabolic demands
for oxygen consumption in the kidney. Int.J.Biochem.
12, 251-255 (1980)
43. Weiss, Ch., Passow, H., Rothstein, A.: Autoregulation
of flow in isolated rat kidney in the absence of
red cells. Am.J.Physiol. 196, 1115-1118 (1959)
44. Wollenberger, A., Krause, E.G., Wahler, B.E.
Über den tatsächlichen Orthophosphat- und N-Phosphoryl-
kreatin-Gehalt des Säugetierherzens. Pflüger's
Arch. 270, 413-427 (1960)
45. Urbaites, B.K., Kessler, R.H. Actions of inhibitor
compounds on adenine nucleotids of renal cortex and
sodium excretion. Am.J.Physiol. 220, 1116-1123 (1971)
46. Zwiebel, R. Kirsten, R. Eine Mikromethode zur
Bestimmung von Metaboliten im Muskelgewebe. Z.Klin.
Chemie und Klin.Biochemie, 5, 407-411 (1968)
47. Zwiebel, R., Wiechmann, J. Höhmann, B., Kinne, R.
Das Verhalten der Pyridinnukleotide und einiger
Metaboliten in der Nierenrinde bei Normoxie und
Anoxie. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.351, 854-864
(1970)

9.0

LEBENS LAUF

24.10.1948 geb. als Tochter von Waldemar und Ilse Krause,
geborene Bock, in Berlin

1955 - 1961 Besuch der Grundschule

1961 - 1968 Besuch des Droste-Hülshoff-Gymnasiums,
Abschluß des neusprachlichen Zuges mit
Abitur

1968/1969 Pädagogische Hochschule Berlin,
Hauptfach: Politische Weltkunde

1969 Beginn des Medizinstudiums an der
Freien Universität Berlin

1974/1975 Wintersemester, Staatsexamen der Human-
medizin, Freie Universität Berlin

April 1975 bis
Juni 1975 Medizinalassistentin im Institut für
Klinische Physiologie der Freien
Universität Berlin

Juni 75 bis
Sept. 1975 Medizinalassistentin im Städtischen
Krankenhaus Heckeshorn, Pulmologie

Oktober 1975 Medizinalassistentin im Klinikum Westend
bis Januar
1976 der Freien Universität, Abteilung
Hämatologie

April 1976 Medizinalassistentin im Städtischen
bis Juli 1976 Urban-Krankenhaus, Chirurgie

Seit August Assistentin im Städtischen Krankenhaus
1976 - Heckeshorn, Pulmologie

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. K. Hierholzer danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für Anregungen.

Herrn Dr. Schurek, jetzt Medizinische Hochschule Hannover, danke ich für die gute Einarbeitung in das Thema und die bereitwillige Betreuung.

